

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **09-023882**

(43)Date of publication of application : **28.01.1997**

(51)Int.Cl. **C12N 15/09**
C07H 21/04
C12N 1/21
//(C12N 1/21
C12R 1:19)

(21)Application number : **07-173715**

(71)Applicant : **RES DEV CORP OF JAPAN
TAKARA SHUZO CO LTD
FUJITSU LTD**

(22)Date of filing : **10.07.1995**

(72)Inventor : **IMAMOTO FUMIO
ISHINO YOSHIZUMI
FURUSAWA MITSURU
DOI HIROFUMI**

(54) PRODUCTION OF MUTATION GENE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To efficiently produce the various mutation sequences of a gene artificially in a short period.

SOLUTION: This method for producing mutation gene is constituted by cloning a gene DNA sequence to a plasmid DNA in which the splitting and replication of cyclic double chains progress in the same direction from the origin of a replication, transducing this recombinant plasmid into a KH1379 strain (dnaQ49) of Escherichia coli and accumulating the mutation of the gene DNA sequences by replicating the recombinant plasmid DNA in this transformed bacterium.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] **12.06.2002**

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-23882

(43)公開日 平成9年(1997)1月28日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/09		9162-4B	C 12 N 15/00	A
C 07 H 21/04			C 07 H 21/04	B
C 12 N 1/21		7804-4B	C 12 N 1/21	
// (C 12 N 1/21				
C 12 R 1:19)				

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全3頁)

(21)出願番号	特願平7-173715	(71)出願人	390014535 新技術事業団 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(22)出願日	平成7年(1995)7月10日	(71)出願人	591038141 寶酒造株式会社 京都府京都市伏見区竹中町609番地
特許法第30条第1項適用申請有り 平成7年1月9日、 発行の日本経済新聞に掲載		(71)出願人	000005223 富士通株式会社 神奈川県川崎市中原区上小田中4丁目1番 1号
		(72)発明者	今本 文男 大阪府吹田市古江台1丁目9の3
		(74)代理人	弁理士 西澤 利夫
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 変異遺伝子作成方法

(57)【要約】

【課題】 遺伝子の多様な変異配列を人為的に短時間で効率よく作成することのできる新しい方法を提供する。

【解決手段】 環状2本鎖の分裂・複製が単一複製起点から同一方向に進行するプラスミドDNAに遺伝子DNA配列をクローニングし、この組換え体プラスミドDNAを大腸菌K H 1 3 7 9 (d n a Q 4 9) 株に導入し、この形質転換菌内で組換え体プラスミドDNAを複製させることによって遺伝子DNA配列の変異を蓄積する。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 環状2本鎖の分裂・複製が単一複製起点から同一方向に進行するプラスミドDNAに遺伝子DNA配列をクローニングし、この組換え体プラスミドDNAを大腸菌K H 1 3 7 9 (d n a Q 4 9) 株に導入し、この形質転換菌内で組換え体プラスミドDNAを複製させることによって遺伝子DNA配列の変異を蓄積することを特徴とする変異遺伝子作成方法。

【請求項2】 宿主細胞の形質の変化を指標として遺伝子DNA配列の変異を特定する請求項1の変異遺伝子作成方法。

【請求項3】 遺伝子DNA配列を所望の形質に変異させるためのストレス要因存在下で宿主細胞を培養する請求項2の変異遺伝子作成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、変異遺伝子作成方法に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、未知および既知の変異遺伝子配列を人為的に短時間で効率よく作成する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】生物の多様な進化は、その構造や機能をコードする遺伝子DNAの突然変異によってもたらされている。突然変異の生ずる機構としては、遺伝子DNAの複製時における塩基相補性の誤り、DNA上に生じた損傷の修復時の誤り、転移性遺伝要素等が主に研究されているが、不明な点が多いとされている。また、突然変異によるDNA構造変化としては、ミスセンス変異やナンセンス変異を起こす塩基置換、フレームシフト、あるいは染色体レベルでの欠失、重複、逆位、転座などが知られているが、これらの突然変異が自然に発生する確率は極めて低い。例えば、DNA複製時に塩基のミスマッチが自然に発生する確率は、一回のDNA複製で1塩基対当たり 10^{-10} 以下であると見積もられている。

【0003】従って、新規な生物種あるいは遺伝子等を作成するためには、DNAの突然変異を人為的に誘発する必要がある。従来、こうした誘発変異の方法としては、生物個体もしくは細胞を物理的または化学的な変異原(mutagen)で処理する方法が採られてきた。物理的変異原としては、塩基置換を主に生じさせる紫外線(UV)、欠失や転座等の染色体レベルでの大変化を誘発する電離放射線(X線、γ線等)が代表的である。これらの物理的変異原に共通する特徴は、簡便で残留の恐れがなく、かつ定量的に扱えることである。ただし、誘発変異頻度はあまり高くない。化学的変異原としては、塩基置換を生じさせるアルキル化剤(例えば、エチルメタンスルフォネット: EMS、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン: MNNG、エチルニトロソ尿素等)や塩基アナログ(例えば、プロモデオキシリジン、N'アミノシチジン等)、あるいはフレームシフト

2

を生じさせるインターフェース(例えば、ICR化合物等)が知られている。これらの化学的変異原は、誘発変異頻度が高く、主に培養細胞の突然変異誘発に用いられている。特に、EMSやMNNG等のアルキル化剤は、誘発変異頻度が高いために広く用いられているが、化学的安定性に難があり、また多発変異を誘発する傾向があるため、使用には注意を要すると考えられている。

【0004】これらの物理的、化学的変異原の使用により、突然変異の発生頻度を100~1000倍に上げることができる。ただし、目的とする変異に応じて変異原の種類を選択するとともに、変異原の濃度、処理時間、変異発現時間、プレート播種細胞数などを適切に設定することが重要である。そして、このような諸変数は、対象細胞毎に試行錯誤を繰り返して設定する必要がある。

【0005】一方、大腸菌や酵母等では、遺伝子操作を用いて人為的に突然変異株を作成する方法が知られている。例えば、大腸菌でのM 1 3 ファージを用いた部位特異的突然変異、自殺ベクターを用いたトランスポゾン導入、あるいは酵母での挿入型ベクターを用いた遺伝子破壊などである。また、大腸菌では、世代当たりの突然変異率を上げる変異株(mut+)、逆に突然変異をほとんど起こさなくなる変異株(recA⁻、umuC⁻)も知られている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】この発明は、物理的または化学的な変異原を用いることなく、DNA複製時の塩基置換変異を 5×10^{-3} という高頻度で誘発することにより、新規な変異遺伝子配列を簡便かつ短期間で作成することのできる新しい方法を提供することを目的としている。

【0007】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記の課題を解決するものとして、環状2本鎖の分裂・複製が単一複製起点から同一方向に進行するプラスミドDNAに遺伝子DNA配列をクローニングし、この組換え体プラスミドDNAを大腸菌K H 1 3 7 9 (d n a Q 4 9) 株に導入し、この形質転換菌内で組換え体プラスミドDNAを複製させることによって遺伝子DNA配列の変異を蓄積することを特徴とする変異遺伝子作成方法を提供する。

【0008】また、この発明の変異遺伝子作成方法においては、宿主大腸菌の形質の変化を指標として遺伝子DNA配列の変異を特定すること、そして、遺伝子DNA配列を所望の形質に変異させるためのストレス要因存在下で宿主大腸菌を培養することを好ましい態様としてもいる。なお、環状2本鎖の分裂・複製が単一複製起点から同一方向に進行するプラスミドDNAとしては、プラスミドpBR322の一方向複製起点C o l E 1 を有するプラスミドを好適なものとして例示することができる。このプラスミドDNAは、この発明の発明者等によ

50

って既に特許出願されている（特願平6-312261、特願平6-312262）。

【0009】また、大腸菌KH1379 (d n a Q 4 9) 株は、大腸菌KH1380 (d n a Q 4 9) の r e c A⁺ 株であり、変異誘発に関して温度感受性変異株である。以下、実施例を示してこの発明の変異遺伝子作成方法についてさらに詳しく説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

【0010】

【実施例】プラスミドpBR322のCo1E1型複製起点を有するプラスミドDNAにアンビシリン耐性遺伝子 (Amp^R) を含むDNA配列をクローニングして、組換え体プラスミドpTC2 (Amp^R) を作成した。このpTC2 (Amp^R) を、大腸菌KH1380 (d n a Q 4 9) の r e c A⁺ 株であるKH1379 (d n a Q 4 9) に導入し、アンビシリン耐性を指標として形質転換菌を選別したのち、37°Cの温度条件で d n a Q 4 9 変異を誘導しながら形質転換菌を連続的に対数期増殖（1日30サイクル：4日間）させてpTC2 (Amp^R) を複製させた。

【0011】次いで、このpTC2 (Amp^R) を大腸菌1379株から単離して、r e c A⁺ 株である大腸菌JM109株に導入し、この形質転換菌を抗生物質セフ

* オタキシム含有培地で培養し、セフォタキシムのMIC (0.02μg/ml) の10倍濃度 (×10 Cef) の培地でコロニーを形成した形質転換菌を選別した。その結果、大腸菌KH1379 (d n a Q 4 9) 株内で4日間複製した変異体pTC2 (Amp^R) により形質転換された大腸菌からは、アンビシリン耐性菌（約130コロニー）に対して 1.2×10^{-1} (12%) という高頻度でセフォタキシム (×10 Cef) 耐性菌が出現した。さらに、このセフォタキシム耐性菌からプラスミドを分離し、それを再度大腸菌JM109株に導入した形質転換体は、やはりセフォタキシム他規制耐性を示した。なお、変異操作を行わないpTC2 (Amp^R) の場合には、 $6 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ コロニーものアンビシリン耐性菌に対して、セフォタキシム耐性菌は全く出現しなかった。

【0012】従って、この発明の方法により、Amp^R 遺伝子を含むpTC2 (Amp^R) が、4日間という短い変異操作にも係わらず、高い確率でセフォタキシム耐性能 (Cef^R) を獲得したことが確認された。

【0013】

20 【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明の方法によって、遺伝子DNAの多様な変異配列を短期間で効率よく作成することが可能となる。

フロントページの続き

(72)発明者 石野 良純
滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
株式会社内

(72)発明者 古沢 満
東京都江戸川区西葛西6-6-8 西葛西
パークファミリア605

(72)発明者 土居 洋文
神奈川県川崎市中原区上小田中1015 富士
通株式会社内